

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|-----------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 49/00 | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/22146 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/02559 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1997 (29.10.97) (30) Prioritätsdaten: 196 49 971.2 19. November 1996 (19.11.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TURNER, Jonathan [DE/DE]; Ortwindstrasse 7, D-13465 Berlin (DE). DYRKES, Thomas [DE/DE]; Käthe-Kollwitz-Strasse 25, D-16540 Hohenneuendorf (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Königstrasse 25, D-14109 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| (54) Title: OPTICAL DIAGNOSTIC AGENTS FOR DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES BY MEANS OF NEAR INFRA-RED RADIATION (NIR RADIATION) (54) Bezeichnung: OPTISCHE DIAGNOSTIKA ZUR DIAGNOSTIK NEURODEGENERATIVER KRANKHEITEN MITTELS NAHINFRAROT-STRAHLUNG (NIR-STRAHLUNG) (57) Abstract <p>The invention relates to compounds of formula (I): $F_m(-A_1)(-B_n)(-W_o)$ wherein F is a colorant-signal molecule with a maximum absorption value ranging from 600 – 1200 nm; A is a β-amyloid plaque binding biomolecule; B is a β-amyloid plaque binding colorant; and W is a β-amyloid plaque binding hydrophilic low-molecular structural element. The invention also describes the use of these compounds in in vivo and in vitro diagnosis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease by means of near infra-red radiation (NIR radiation) as a contrasting agent in fluorescence and transillumination diagnosis in the NIR range. Diagnostic agents containing said components are also disclosed.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I): $F_m(-A_1)(-B_n)(-W_o)$, worin F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm aufweist; A ein an β-Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist; B ein an β-Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist; W ein an β-Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles, niedermolekulares Strukturelement ist; sowie die Verwendung dieser Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten, wie der Alzheimerschen Krankheit, mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung) als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im NIR-Bereich und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshjan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CZ | Tschechische Republik | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dänemark | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

Optische Diagnostika zur Diagnostik neurodegenerativer
Krankheiten mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung)

5 Die Erfindung betrifft Verbindungen zur In-vivo- und In-
vitro-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels
Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung), die Verwendung
dieser Verbindungen als optische Diagnostika und diese
Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel.

10

Die Alzheimersche Krankheit (AD) ist die häufigste Form
der fortgeschrittenen Demenz bei älteren Menschen. Die
Häufigkeit des Auftretens der AD steigt mit dem Alter der
Patienten und erreicht Werte von 40%-50% in der Alters-
15 gruppe zwischen 85 und 90 Jahren. Die AD kann nur post
mortem durch die Untersuchung der Gehirne der Patienten
bei einer Autopsie mit Sicherheit diagnostiziert werden.
Die Gehirne der Alzheimer-Patienten enthalten viele cha-
rakteristische Amyloid-Plaques im neuronalen Gewebe und
20 in der Umgebung von Blutgefäßen, die von dystrophierten
Neuriten und neurofibrilliären "Tangles" umgeben sind.
Ferner weisen die Gehirne der Alzheimer Patienten eine
geringe Zahl von Synapsen auf. Im fortgeschrittenen Sta-
dium der Krankheit ist eine weitreichende Degeneration
25 neuronaler Strukturen und eine signifikante Abnahme des
Gehirnvolumens festzustellen (Wiesniewski, H.M., Weigel,
J., Alzheimer's disease neuropathology. Current status of
interpretation of lesion development. Ann NY Acad Sci
1992, 673:270-84)

30

Die Amyloid-Plaques bestehen unter anderem aus dem Amy-
loid- β -Peptid (A β), einem aus 40 bis 42 Aminosäuren be-
stehenden Fragment des β -Amyloid Vorläuferproteins (APP)
(Master, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., et al. Amyloid
35 plaque core protein in Alzheimer disease and Down syn-
drome. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82:4245-9; Kang, J.,

Lemaire, H.G., Unterbeck, A. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 1987, 325:733-6). Die Zahl der Plaques korreliert nicht mit dem Grad der fortgeschrittenen Demenz, ist aber ein frühes und sicheres Diagnostikum für das Auftreten der Alzheimerschen Krankheit. Dies führt zur Hypothese, daß die ersten Ablagerungen von Aß lange vor der Manifestation der AD stattfinden und bevor die ersten klinischen Symptome auftreten (Hardy, L., Allsop, D., Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci 1991, 12:383-8).

Eine Methode, die aber die Amyloid-Plaques quantitativ vor dem Tod des Patienten frühzeitig erfaßt, hätte großen Einfluss auf die weitere Erforschung der AD und auf die Entwicklung von neuen wirksamen Therapiekonzepten gegen die AD.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existiert kein direkter Nachweis der Amyloid-Plaques in den Gehirnen der AD-Patienten. Das Ausmaß der AD wird heute nur indirekt anhand des Gehirnvolumens oder von Stoffwechselstörungen betroffener Gehirnbereiche (MRT und PET) diagnostiziert. Der gravierende Nachteil dieser Methoden ist aber der nur indirekte Nachweis der AD, welcher oft mit hohen statistischen Schwankungsbreiten der Ergebnisse verbunden ist. Die Nachweisempfindlichkeit dieser Methoden gegenüber einem direkten Nachweis der Amyloid-Plaques ist daher als gering einzuschätzen.

Es sind mehrere Verfahren zur Durchstrahlung und bildgebenden Diagnose von biologischen Geweben mit langwelligen Licht des Wellenlängenbereiches von 600 bis 1200 nm (Nah-Infrarot-Diagnostik) bekannt. Da biologisches Gewebe eine relativ hohe Durchlässigkeit für langwelliges Licht die-

ses Spektralbereiches besitzt, steht dem Diagnostiker hiermit neben den modernen bildgebenden Verfahren, wie Röntgen, Magnetresonanztomographie oder Ultraschalldiagnostik, ein weiteres Verfahren zur bildlichen Gewebedarstellung zur Verfügung (Haller, E.B. Time-resolved transillumination and optical tomography. J Biomed Optics 1996, 1:7-17). Die Verwendung von NIR-Strahlung zur ortsabhängigen Aufzeichnung von Blutfluß und Oxygenierungsgrad im Gehirn von Säuglingen durch die Detektion der Absorption von Hämoglobin/Deoxyhämoglobin ist ein seit Jahren bekanntes und angewandtes Verfahren (Jöbsis, F.F., Noninvasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. Science 1977, 198:1264-67; Chance, B., Leigh, J.S., Miyake, H. et al. Comparison of time-resolved and unresolved measurements of deoxyglobin in brain. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:4971-75; Benaron D.A. et al. Optical time-of-flight and absorbance imaging of biological media. Science 1993, 33: 369A.).

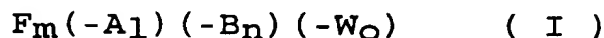
In der Nah-Infrarot-Diagnostik kann sowohl die Detektion der nicht absorbierten Strahlung in Form einer Transmissionsdarstellung als auch die nach Bestrahlung mit nahinfrarotem Licht emittierte Fluoreszenzstrahlung gewebespezifische Informationen liefern.

Das wesentliche Problem bei der Nutzung von nahinfraroter Strahlung ist die starke Steuerung des Lichtes, so daß selbst bei unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften von einem scharf begrenzten Objekt und seiner Umgebung sich dieses Objekt nur unscharf abzeichnet. Das Problem nimmt mit wachsender Entfernung des Objektes von der Oberfläche zu und kann als hauptsächlicher limitierender Faktor sowohl bei der Transillumination als auch bei der Detektion von Fluoreszenzstrahlung angesehen werden.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen zur Verfügung zu stellen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

5

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß Verbindungen der allgemeinen Formel I



10

worin

F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm aufweist,

15

A ein an β -Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist, B ein an β -Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist, W ein an β -Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles, niedermolekulares Strukturelement ist,

20

m für die Zahl 1 oder 2 steht oder, mit der Maßgabe, daß n und o Null bedeuten, für eine ganze Zahl 3 - 20 steht,

l und n unabhängig voneinander für eine Zahl 0, 1 oder 2 stehen,

25

o für eine ganze Zahl 0, 1, 2, 3 oder 4 steht, mit der Maßgabe, daß die Summe aus l, n und o ≥ 1 ist

sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

30

zur Verfügung gestellt werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich die erfindungsgemäßen Verbindungen an die Amyloid-Plaques oder Bestandteile der Amyloid-Plaques lagern, binden oder dort anreichern und damit zu einer Vereinheitlichung und

35

Erhöhung der Absorption und Fluoreszenz dieser zu detektierenden Areale führen.

Die In-vivo-Detektion von β -Amyloid-Ablagerungen unter Verwendung von NIR-Strahlung erfordert Farbstoffe als Kontrastmittel, die im Wellenlängenbereich von 600 bis 1200 nm eine hohe Absorption und Fluoreszenzquantenausbeute besitzen und selektiv an β -Amyloid-Ablagerungen binden.

10

Farbstoffe aus der Klasse der Polymethine besitzen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften, die durch hohe molare Absorptionskoeffizienten zwischen 600 und 1200 nm und hinreichende Fluoreszenzquantenausbeuten charakterisiert sind. Farbstoffe dieser Klasse verfügen in der Regel über eine hohe Photostabilität.

15

Überraschenderweise wurde gefunden, daß zur Verbesserung der Differenzierung zwischen normalem und erkranktem Gewebe Fluoreszenzfarbstoffe geeignet sind, die sich im erkrankten Gewebe anreichern oder an pathologisch veränderten Gewebekomponenten selektiv binden und ein spezifisches Absorptions- und Emissionsverhalten besitzen.

20

In der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I an die β -Amyloid-Plaques binden. Die durch Absorption des Farbstoffes bewirkte Änderung des (gestreuten) eingestrahlten Lichtes und/oder die durch die Anregerstrahlung induzierte Fluoreszenz wird detektiert und liefert die eigentlichen gewebespezifischen Informationen, die eine Aussage über den Grad der pathogenen Veränderung ermöglichen.

30

Erfindungsgemäß werden solche Farbstoffe als Signalmoleküle F verwendet, die kovalent mit selektiv an β -Amyloid-

35

Plaques bindende Strukturen verknüpft bzw. mit derartigen Strukturen substituiert sind.

Erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I

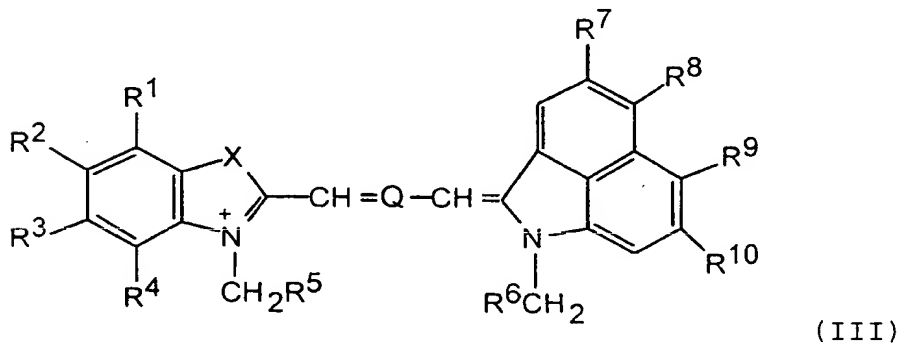
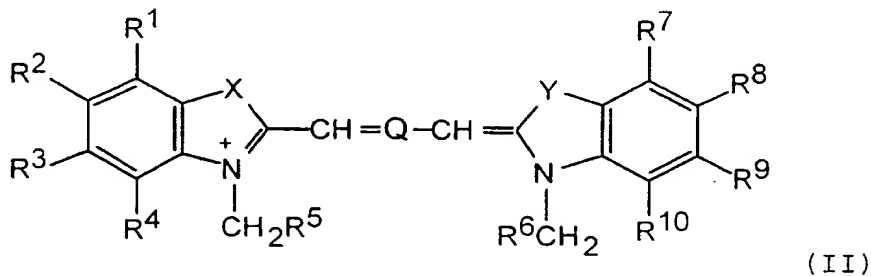
a) 1 und n Null bedeuten, m für eins und o für 1-4 steht, oder

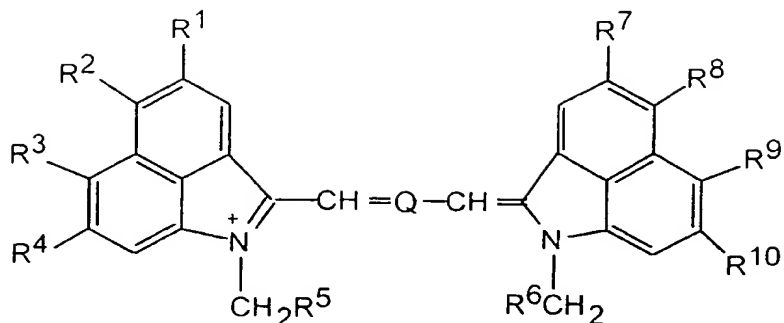
b) n und o Null bedeuten, m für 3-20 und l für 1-2 steht, oder

c) 1 und o Null bedeuten, m für 1-2 und n für 1-2 steht, unter der Maßgabe, daß die Summe aus n und m kleiner gleich 3 ist.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-, Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff steht.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F für einen Cyanin-, Squarilium- oder Croconiumfarbstoff der allgemeinen Formeln II - IV



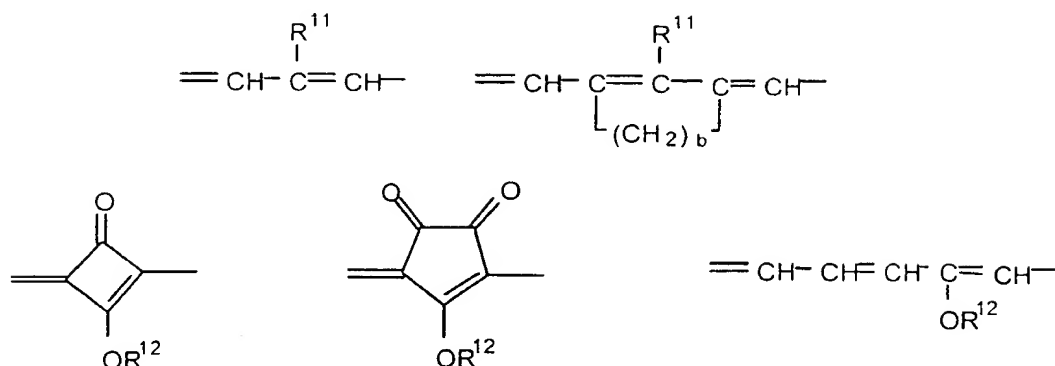


(IV)

worin

- 5 R^1 bis R^4 und R^7 bis R^{10} unabhängig voneinander für ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder für einen Rest $-\text{COOE}^1$, $-\text{CONE}^1\text{E}^2$, $-\text{NHCOE}^1$, $-\text{NHCONHE}^1$, $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$, $-\text{OSO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$, $-\text{E}^1$,
- 10 wobei E^1 und E^2 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C_1 - C_{50} -Alkylkette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische
- 15 oder gesättigte zyklische C_5 - C_6 - oder bizyklische C_{10} -Einheiten formen können, steht, und wobei die C_1 - C_{50} -Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substitu-
- 20 iert ist,
- stehen, und wobei jeweils benachbarte Reste R^1 - R^4 und/oder R^7 - R^{10} unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,
- 25 oder für eine Bindung an A, B oder W stehen,
- R^5 und R^6 unabhängig voneinander für einen Rest $-\text{E}^1$ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C_1 - C_4 -Sulfoalkylkette stehen,

Q ein Fragment



5

worin

R^{11} für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder einen Rest $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$ oder $-\text{E}^1$, wobei E^1 und E^2 die oben

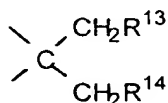
10

angegebene Bedeutung haben, steht, R^{12} für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E^1 mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

15

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet, darstellt,

X und Y unabhängig voneinander O, S, $-\text{CH}=\text{CH}-$ oder ein Fragment



20

worin

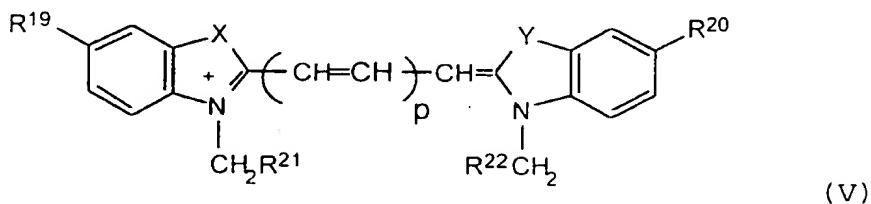
R^{13} und R^{14} unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige $\text{C}_1 - \text{C}_{10}$ -Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann, stehen, und wobei die Reste R^{13} und

25

R¹⁴ unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können, bedeuten,

steht.

Insbesondere bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel V



worin

p eine ganze Zahl 2 oder 3 bedeutet,

X und Y unabhängig voneinander für O, S, -CH=CH- oder C(CH₃)₂ stehen,

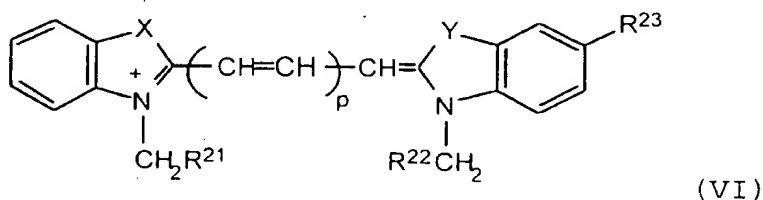
R¹⁹ und R²⁰ unabhängig voneinander einen Rest -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃H, -SO₃H, -E¹, wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben, mit der Maßgabe, daß E¹ und E² nicht gleichzeitig Wasserstoffatome sind, darstellen,

R²¹ und R²² unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung, für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette

oder R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²², E¹ oder E² für eine Bindung an A, B oder W mit der oben angegebenen Bedeutung stehen,

darstellt.

Insbesondere bevorzugt sind ferner Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F einen Cyaninfarbstoff der
5 allgemeinen Formel VI



worin

10 p , X , Y , R^{21} und R^{22} die oben angegebene Bedeutung haben,

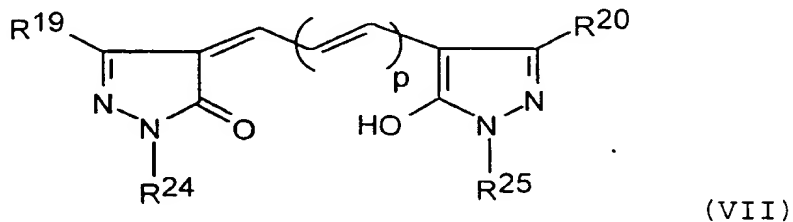
R^{23} für $-OE^3$, $-COOE^3$, $-CONHE^3$, $-CONH(CH_2)_{1-6}-NHE^3$, $-CONH(CH_2)_{1-6}-OE^3$, $-CONH(CH_2)_{1-6}-COOE^3$ oder $-CONH(CH_2)_{1-6}-CONHE^3$ steht, worin

15 E^3 für ein Mono-, Oligo- oder Polysaccharid mit mindestens einem Rest $-OSO_3H$ steht,

darstellt.

20

Insbesondere bevorzugt sind außerdem Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen F einen Oxonolfarbstoff der allgemeinen Formel VII,



25

worin

p , R^{19} und R^{20} die oben angegebene Bedeutung haben,

5 R^{24} und R^{25} unabhängig voneinander für einen einfach bis dreifach mit Hydroxy-, Carboxy-, Sulfat-, Sulfo-
nat, Alkyl- oder Alkoxy- oder Carbonsäureesterresten
substituierten Phenylring stehen,

darstellt.

10 Erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I sind solche, in denen A beispielsweise für Antikörper, Antikörperfragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Lipoproteine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder
15 verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

20 Bevorzugte Peptide sind das β -Amyloid 1-40, 1-42 und 1-43, sowie Teilstrukturen und Derivate derselben. Besonders bevorzugt sind die β -Amyloide und Teilstrukturen der β -Amyloide, die mit der Aminosäure Cystein modifiziert sind, wobei die Bindung zum F über die Sulfhydrylgruppe des Cysteins mittels einer Maleimidostruktur erfolgt.

25 Monomere Aminosucker sind beispielsweise Glucosamin, Galaktosamin, Mannosamin, Gulosamin, Fucosamin, 3-Amino-3-desoxy-ribose, Kanosamin, Mycosamin, Mycaminose, Desosamin, Rhodosamin, 6-Amino-6-desoxy-glucose, Neosamin, Paromose.

30 Aminosucker-carbonsäuren sind beispielsweise Glucosaminsäure, Glucosaminuronsäure, Muraminsäure, Trehalosamin, Chondrosin und -derivate, Chitotriose.

35 Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel I, in denen die Bindung an F zwischen Aminogruppe des Zuckers

und Carboxygruppe des Farbstoffes unter Bildung einer Amidgruppe erfolgt ist.

Bevorzugt sind außerdem Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Mono-, Di-, Tri- und Oligosacchariden für A, dessen glycosidische Hydroxygruppe in eine Aminogruppe übergeführt wurde, wobei die Kopplung an eine Carboxygruppe des Farbstoffes F unter Bildung einer Amidgruppe erfolgt ist.

Mono- bis oligomere Saccharide sind Aldo- und Ketotriosen bis Aldo- und Ketoheptosen, Ketooktosen und Ketononosen, Anhydrozucker, Cyclite, Amino- und Diaminozucker, Desoxyzucker, Aminodesoxyzucker, Monocarbonsäurezucker, Amino- zucker-carbonsäuren, Aminocyclite, Phosphor-enthaltende Derivate der Mono- bis Oligomere.

Beispiele für geeignete Polysaccharide sind Fucoidan, Arabinogalactan, Chondroitin und -sulfate, Dermatan, Heparin, Heparan, Heparitin, Hyaluronsäure, Keratan, Polygalacturonsäure, Polyglucuronsäure, Polymannuronsäure, Inulin, Polylactose, Polylactosamin, Polyinosinsäure, Polysucrose, Amylose Amylopektin, Glycogen, Nigeran, Pullulan, Asparagosin, Sinistrin, Sitosin, Galactocaclose, Luteose, Galactan, Mannane, Guaran, Glucomannane, Galactoglucomannane, Phosphomannane, Fucane, Pektine, Cyclodextrine und die chemisch und/oder enzymatisch hergestellten Derivate, Abbau- und Spaltprodukte der hochmolekularen Verbindungen.

Besonders bevorzugte Mono-, Oligo- und Polysaccharide sind sulfatierte bzw. polysulfatierte Strukturen.

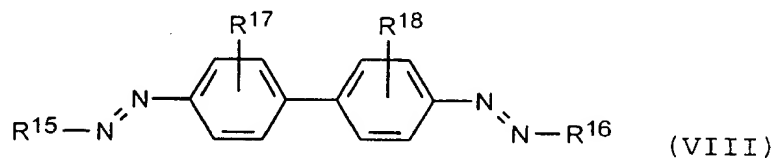
Sulfatierte Strukturen sind beispielsweise Glucosamin-3-sulfat, Glucosamin-6-sulfat und solche Strukturen, die sich durch Sulfatierung mit geeigneten Reagenzien aus den

oben beschriebenen Mono-, Di-, Tri- bis Oligo-, sowie Polysacchariden erhalten lassen

Sulfatierungen beispielsweise nach Jaurand, G., et al., Carbohydrate Research 1994, 255:295-301; Böcker, T., et al., Carbohydrate Research, 1992, 230: 245-256.

Erfindungsgemäß selektiv an β -Amyloid-Plaques bindende Farbstoffstrukturen B sind Diazofarbstoffe, die kovalent an die Signalmoleküle gebunden sind. Geeignete Diazofarbstoffe sind beispielsweise Kongorot, Chrysamin G, Evans Blue, Chicago Sky Blue 6B, Direct Red[®]-Farbstoffe, Direct Yellow[®]-Farbstoffe, Ponceau[®]-Farbstoffe, Reactive Black 5, Calcion.

Bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel I sind solche, in denen B einen Diazofarbstoff der allgemeinen Formel VIII



worin

R¹⁵ und R¹⁶ unabhängig voneinander für einen mit einer oder mehreren Hydroxy-, Carboxy-, Amino-, Sulfonsäure-, Alkoxycarbonyl-, Alkylamino-, Dialkylamino-, Alkoxy-, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen im Alkylrest, oder Arylsulfonylgruppen, mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen im Arylrest, substituierten Phenyl- oder Naphthylrest,

oder für einen Farbstoff F, steht,

R¹⁷ und R¹⁸ unabhängig voneinander für einen Hydroxy-, Carboxy-, Sulfonsäure-, Alkyl-, Alkoxyrest, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, stehen, darstellt.

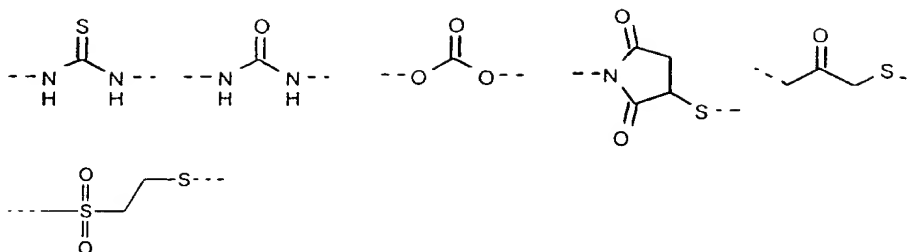
5

Bevorzugte erfindungsgemäße Verbindungen der allgemeinen Formel I sind ferner solche, in denen W für einen Rest -OSO₃H oder -SO₃H, einen unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkynyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkylrest mit bis zu 60 C-Atomen, welcher mit bis zu 5 Hydroxygruppen, bis zu 3 Carbonsäuregruppen und mindestens einem Rest -OSO₃H oder -SO₃H substituiert ist, steht.

Bevorzugt sind solche Verbindungen nach der allgemeinen Formel I, in denen W eine sulfatierte Struktur bedeutet, die sich durch Sulfatierung entsprechender Hydroxyverbindungen darstellen läßt.

Geeignet sind beispielsweise Aminoalkohole, wobei zwischen Aminogruppe und Carboxygruppe des Farbstoffes unter Bildung einer Amidgruppe die Verknüpfung erfolgt ist und die Hydroxygruppen sulfatiert sind. Beispiele für Aminoalkohole sind 2-Amino-1-ethanol, 3-Amino-1-propanol, 4-Amino-1-butanol, 5-Amino-1-pentanol, 6-Amino-1-hexanol, 3-Amino-1,2-propandiol, 2-Amino-1,3-propandiol, 3-Amino-1,2,4-butantriol, Hydroxyaniline, 4-Aminoresorcin.

Signalmolekül und spezifisch bindende Struktureinheit sind über übliche funktionelle Gruppen miteinander verbunden. Solche Gruppen sind beispielsweise Ester, Ether, sekundäre und tertiäre Amine, Amide und im folgenden aufgeführte Strukturen



Die Darstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der
 5 allgemeinen Formel I erfolgt durch Modifikation von Poly-
 methinfarbstoff-Grundkörpern, welche koppelbare Funktio-
 nalitäten (z. B. Carboxyl-, Amino-, Hydroxylgruppen)
 enthalten, nach den dem Fachmann bekannten Verfahren.

10 Diese Gruppen werden entsprechend unter Erhalt der Struk-
 tur der Ausgangsverbindungen, in an sich bekannter Weise
 durch Reaktion mit entsprechenden Substituenten modifi-
 ziert.

15 Die Synthese der Polymethinfarbstoff-Grundkörper erfolgt
 nach literaturbekannten Methoden, beispielsweise F.M. Ha-
 mer in The Cyanine Dyes and Related Compounds, John Wiley
 and Sons, New York, 1964; Cytometry, 10, (1989), 3-10; 11
 (1990) 418-430; 12 (1990) 723-30; Bioconjugate Chem. 4
 20 (1993) 105-11, Anal. Biochem. 217 (1994) 197-204, Tetra-
hedron 45 (1989) 4845-66, EP-0 591 820 A1, J. Org. Chem.
 60 (1995) 2361-95.

Die Darstellung der erfindungsgemäßen Farbstoff-Biomole-
 25 kül-Addukte (l ungleich Null in der allgemeinen Formel I)
 erfolgt durch Umsetzung des Farbstoffes mit einem Biomo-
 lekül A nach literaturbekannten Methoden. Die Farbstoffe
 müssen dazu koppelbare Reaktivgruppen besitzen bzw. muß
 der Farbstoff durch Generierung dieser Gruppen in-situ
 30 oder zuvor aktiviert werden. Gegenüber Amino- und Sulfhy-
 drylgruppen eines Biomoleküls reaktive Gruppen sind bei-
 spielsweise N-Hydroxysuccinimidylester, N-Hydroxy-succin-

imidylester-3-sulfat, Isothiocyanate, Isocyanate, Maleimid-, Halogenacetyl-, Vinylsulfongruppen. Die Kopplung erfolgt vorzugsweise in wäßrigem Medium. Der Beladungsgrad ist dabei durch die Stöchiometrie und Reaktionszeit steuerbar. Literatur: Synth. Commun. 23 (1993) 3078-94, DE-OS 3912046, Cancer Immunol. Immunother. 41 (1995) 257-263, Cancer Research 54 (1994) 2643-49.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vivo-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels NIR-Strahlung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I zur In-vitro-Diagnostik.

Dazu werden Gewebeproben oder Biopsieproben gewonnen und auf ihren Gehalt an β -Amyloid-Faltblattstrukturen untersucht werden.

Überraschenderweise binden die erfindungsgemäßen Farbstoffe selektiv an die zu untersuchenden Proben und erlauben eine Auswertung anhand der spezifisch emittierten Fluoreszenz im nahinfraroten Spektralbereich.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner auch diagnostische Mittel zur In-vivo-Diagnostik, welche Verbindungen der allgemeinen Formel I zusammen mit den üblichen Hilfs- und Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthalten.

Erfindungsgemäß wird dem Gewebe bei der Verwendung zur In-vivo-Diagnostik eine oder mehrere der Substanzen, vorzugsweise intrathekal, intralumbal oder intravenös, zugeführt und Licht aus nahinfraroten Spektralbereich einge-

strahlt. Das nicht absorbierte, gestreute Licht und/oder die vom Farbstoff emittierte, gestreute Fluoreszenzstrahlung werden gleichzeitig/einzeln registriert. Bevorzugt sind die Methoden, bei denen das Gewebe großflächig be-
5 strahlt und die Fluoreszenzstrahlung örtlich aufgelöst durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera dargestellt wird oder die abzubildenden Gewebeareale mit einem Lichtleiter abgerastert und die erhaltenen Signale rechnerisch in ein synthetisches Bild umgesetzt werden. Darüberhinaus kann
10 die Fluoreszenz spektral und/oder phasenselektiv sowie stationär und/oder zeitaufgelöst ausgewertet werden.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Verbindungen beispielsweise gegenüber radiodiagnostischen Verfahren
15 liegt darin, daß bei Verwendung stabiler Farbstoffe das Fluoreszenzsignal auch nach längeren Zeiträumen nach Applikation durch Anregung des Farbstoffes erzeugt und detektiert werden kann. Es steht ein längeres Zeitfenster für die Diagnose zur Verfügung, da Limitationen bei-
20 spielsweise durch Zerfallshalbwertszeiten nicht vorhanden sind.

Mit der erfindungsgemäßen Verwendung wird eine nicht invasive diagnostische Methode zur Verfügung gestellt, die
25 den direkten Nachweis der Amyloid-Plaques in-vivo ermöglicht.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

30 Beispiel 1:

Darstellung von N-(2,3-Disulfato)propyl-1,1'-Bis-(4-Sul-
fobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Trinatrium-
salz

35

- 1) 1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidylester, Natriumsalz

5 Zu einer Lösung von 0,5 g (0,7 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-
butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure und 0,1 g (0,9
mmol) N-Hydroxysuccinimid in 30 ml wasserfreiem DMF wer-
den bei 0 °C unter Argon 0,15 g (0,75 mmol) N,N'-Dicyclo-
hexylcarbodiimid in 5 ml getropft. Es wird 72 h bei Raum-
temperatur gerührt. Anschließend wird das Lösemittel im
10 Hochvakuum bei 40 °C bis auf ca. 5 ml abgedampft und der
Rückstand mit 200 ml Diethylether verrührt. Nach Dekan-
tieren des Ethers vom ausgefallenen Niederschlag wird er-
neut mit 5 ml Dimethylformamid versetzt und der beschrie-
bene Vorgang wiederholt. Der erhaltene Niederschlag wird
15 im Hochvakuum getrocknet und bei -20 °C unter Argon auf-
bewahrt.

Ausbeute: 0,55 g (97%), tiefblaues Pulver

- 20 2) N-(2,3-Dihydroxy)propyl-1,1'-bis-(4-sulfobutyl)-
indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz

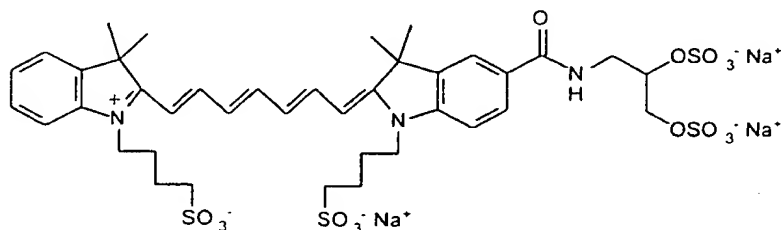
0,5 g (0,61 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbo-
cyanin-5-carbonsäure-N-hydroxy-succinimidylester in 20 ml
25 Dimethylformamid werden mit einer Lösung von 0,15 g (0,92
mmol) 2-Aminomethyl-5,5-dimethyl-1,3-dioxolan-hydrochlo-
rid und 0,1 g (1,1 mmol) Triethylamin in 20 ml Dimethyl-
formamid versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt.
Die Aufarbeitung erfolgt wie oben beschrieben. Das Roh-
30 produkt wird in 30 ml Wasser/MeOH/Essigsäure (3:1:2) 18 h
bei Raumtemperatur gerührt und die Lösung direkt einer
chromatographischen Reinigung unterzogen (Europrep, 60-30
C18, 60A, 20-45 µ, Laufmittel: Wasser / Methanol).

Ausbeute: 0,25 g (52%), blaues Lyophilisat

35

3) N-(2,3-Disulfato)propyl-1,1'-bis-(4-sulfobutyl)-
indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Trinatriumsalz

0,25 g (0,32 mmol) N-(2,3-Dihydroxy)propyl-1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid werden zusammen mit 0,22 g (1,6 mmol) Schwefeltrioxid-Trimethylamin-Komplex in 15 ml Dimethylformamid 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft, mit Ether verrührt und der ausgefallene Feststoff chromatographisch gereinigt (Europrep, 60-30 C18, 60A, 20-45 μ , Laufmittel: 0,5-proz. NaCl-Lösung/Methanol). Ausbeute: 0,20 g (64%), blaues Lyophilisat



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 746 \text{ nm}$

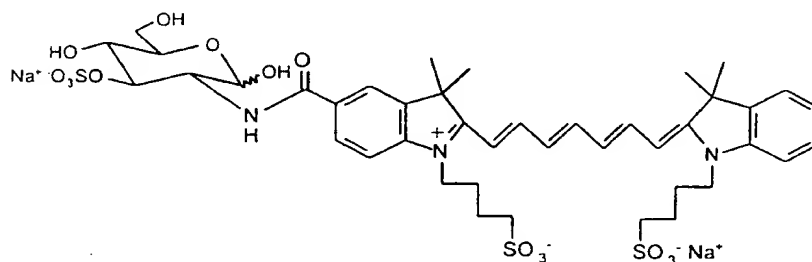
$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 780 \text{ nm}$

Beispiel 2:

Bis-1,1'-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure- α -D-glucosamid-3'''-sulfat, Dinatriumsalz (2)

Zu einer Lösung von 0,5 g (0,7 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure und 0,1 g (1,0 mmol) Triethylamin in 20 ml wasserfreiem Dimethylformamid werden 0,23 g (0,7 mmol) Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) gegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemp. werden eine Lösung von 0,36 g (1,4 mmol) α -D-Glucosamin-3-sulfat und 0,15 g (1,5 mmol) Triethylamin in 25 ml wasserfreiem Dimethylformamid zuge-
tropft. Es wird weitere 3 h bei Raumtemp. gerührt, das

Lösemittel im Hochvakuum bei 40°C abgedampft und der Rückstand mit Diethylether verrührt. Der gebildete Feststoff wird abfiltriert und chromatographisch an RP-Kieselgel Europrep, 60-30 C18, 60A, 20-45 μ , Stufengradient: 100% 0,5-proz. NaCl-Lsg. -> 90% 0,5-proz. NaCl-Lsg / 10% Methanol -> 90% Wasser / 10% Methanol -> 50% Methanol) gereinigt und abschließend gefriergetrocknet. Ausbeute: 0,51 g (76%), blaues Lyophilisat



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 745 \text{ nm}$

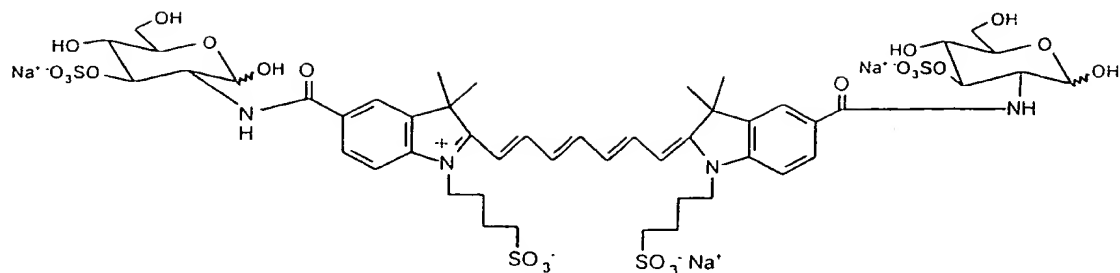
$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 779 \text{ nm}$

15 Beispiel 3:

Bis-1,1'-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin-5,5'-dicarbonsäure-di- α -D-glucosamid-di-3''-sulfat, Trinatriumsalz (3)

20 Die Darstellung und Reinigung erfolgt analog Beispiel 2 ausgehend von 0,5 g (0,66 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5,5'-dicarbonsäure, 0,2 g (2,0 mmol) Triethylamin in 25 ml Dimethylformamid, Zugabe von 0,43 g (1,32 mmol) TBTU sowie 0,69 g (2,64 mmol) α -D-Glucosamin-3-sulfat und 0,3 g (3 mmol) Triethylamin in 30 ml Dimethylformamid.

Ausbeute: 0,56 g (66%), blaues Lyophilisat



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 754 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 790 \text{ nm}$

5

Beispiel 4:

N-Chondrosin-Bis-1,1'-(4-Sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz (4)

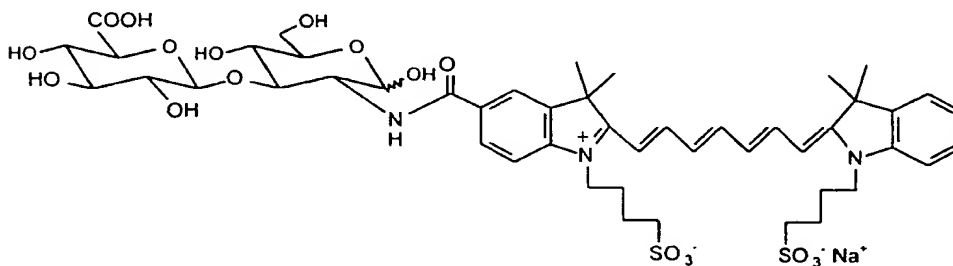
10

Die Darstellung erfolgt analog Beispiel 2 ausgehend von 0,5 g (0,7 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure unter Verwendung von 0,43 g (1,2 mmol) Chondrosin. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Die Reinigung erfolgt mittels HPLC (Säule: 250x20 mm, Nucleosil 100C18, 7 mm, Eluens 50 mM Phosphat-Puffer pH4 / MeOH, 5% auf 95% MeOH in 60 min) mit anschließender Entsalzung an RP-Kieselgel und Gefriertrocknung.

15

Ausbeute: 0,35 g (48%), blaues Lyophilisat

20



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 746 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 779 \text{ nm}$

25 Beispiel 5:

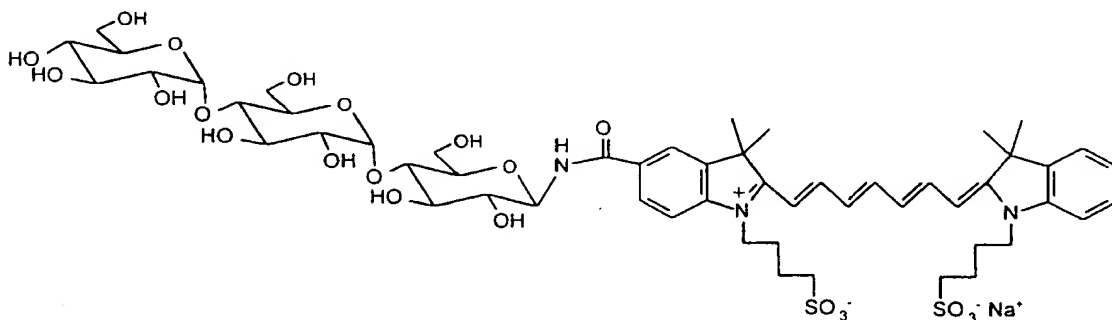
Maltotriose-Indotricarbocyanin-Addukt

1) Darstellung von 1-Amino-1-deoxy-Maltotriose

5 0,2 g Maltotriose werden in 5 ml einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonat 7 Tage bei 30°C gerührt. Zur Entfernung überschüssigen Ammoniumhydrogencarbonats wird die Lösung bis zur Gewichtskonstanz mehrfach lyophilisiert.

10 2) Kopplung mit 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure

Eine Lösung von 0,1 g (0,14 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure und 15 mg Triethylamin in 5 ml Dimethylformamid wird mit 0,05 g (0,15 mmol) O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat (TBTU) versetzt und 30 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden 0,14 g (0,28 mmol) 1-Amino-1-deoxy-Maltotriose zugegeben und weitere 5 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Entfernen des Dimethylformamids bei 40°C im Hochvakuum wird der Rückstand mit Ether verrührt, abfiltriert und chromatographisch gereinigt (Europrep, 60-30 C18, 60A, 20-45 µ, Laufmittel: Wasser / Methanol). Ausbeute nach Gefriertrocknung 50%.



$\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 748 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 779 \text{ nm}$

Beispiel 6:

Heparin-Indotricarbocyanin-Addukt

- 5 0,25 g Heparin (niedermolekular, M ca. 6000 g/mol, Fa. Sigma) werden in Anlehnung an Nagasawa K. und Inoue Y. (Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. III, 1980, 291-294) partiell de-N-sulfatiert (25°C für 3 h ; Ausbeute 0,20 g) .
- 10 0,10 g partiell de-N-sulfatiertes, niedermolekulares Heparin werden in 40 ml Phosphatpuffer (0,1 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8,3) mit einer Lösung von 0,12 g (0,15 mmol) 1,1'-Bis-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidylester, Natriumsalz (siehe Beispiel
- 15 1) in 4 ml Dimethylformamid versetzt und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Es erfolgt eine Reinigung mittels Ultrafiltration mit dest. Wasser (Centriprep 3000, Fa. Amicon), Gefriertrocknung und 5-stdg. Trocknung bei 50°C im Hochvakuum.

20

Schwefelgehalt (Bestimmung mittels ICP-AES)

| | |
|----------------------------------|-------|
| S(%) Heparin | 11,55 |
| S(%) partiell de-N-sulfatiert | 10,02 |
| S(%) nach Labeling mit Farbstoff | 10,89 |

25

 $\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 750 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 782 \text{ nm}$ 30 Beispiel 7:Indotricarbocyanin-Cys- β -Amyloid-Addukte

- 1) Darstellung von N-[3-(3-Maleimidobenzoyl)aminopropyl]-
- 35 bis-1,1'-(4-sulfo-butyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz

1,1'-Bis-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäure wird in Anlehnung an bekannte Literaturverfahren durch Umsetzung mit 3-Aminopropyl-t-butylcarbamat, Freisetzung
 5 der Aminogruppe durch saure Spaltung mit Trifluoressigsäure und Umsetzung mit 3-Maleimidobenzoesäurechlorid in o. g. Verbindung übergeführt.

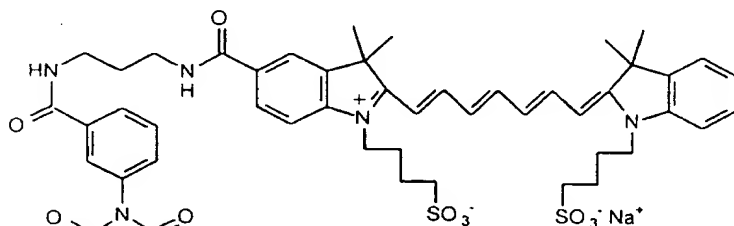
2a) Labeling von Cys- β -Amyloid(1-40)

10

Alle Lösungsmittel sind durch Sättigung mit Argon vom Sauerstoff befreit.

10 mg lyophilisiertes Cys- β -Amyloid(1-40) werden in 1 ml Phosphatpuffer pH 7,8 / DMF (2:1-Gemisch) gelöst und mit
 15 10 mg N-[3-(3-Maleimidobenzoyl)aminopropyl]-bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indotricarbocyanin-5-carbonsäureamid, Natriumsalz versetzt. Es wird 3 h bei Raumtemp. gerührt, mit 5 ml Wasser verdünnt und die Lösung lyophilisiert.

Reinigung mittels HPLC (Säule: Merck Select B, 5 μ ; Laufmittel: Wasser + 0,05% Trifluoressigsäure, Acetonitril)
 20 ergibt 4 mg Produkt.



C DAEFR HDSGY EVHHQ KLVFF AEDVG SNKGA IIGLM VGGWV

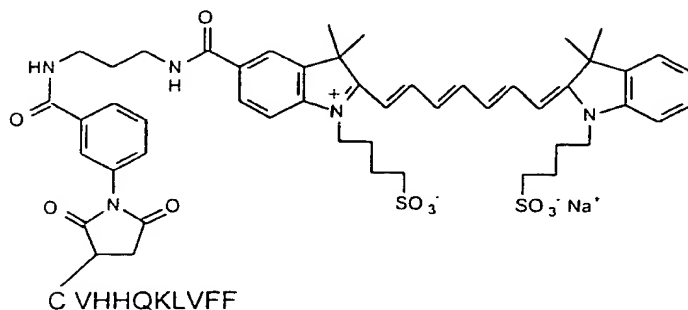
25 $\lambda_{\text{max, Absorption}} (\text{H}_2\text{O}) = 747 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{max, Fluoreszenz}} (\text{H}_2\text{O}) = 780 \text{ nm}$

2b) Labeling von Cys- β -Amyloid(12-20)

30

Die Umsetzung wird analog 2a) durchgeführt. 5 mg Cys- β -Amyloid(12-20) werden mit 10 mg Farbstoff versetzt und 2,5 h bei Raumtemp. gerührt. Man erhält 6 mg Produkt nach Reinigung durch HPLC.

5



Beispiel 8:

10

Bindungsassay zur Messung der Bindung der Farbstoff-Konstrukte an β A4-Peptid durch Fluoreszenzdetektion

- 1) Herstellung der β A4-Peptid-beschichteten Membranen und
 15 Inkubation mit β A4-bindenden Farbstoff-Konstrukten

Der Bindungsassay erfolgte an β A4-Peptid-beschichteten Nitrocellulosemembranen (Cellulosenitrat-Membranfilter CN; 0,4 μ m, Fa. Schleicher&Schuell). Die Beschichtung der
 20 Membran erfolgte in einer Dot-Blot-Kammer (Fa. Strata-gene). Die Membran und das Blotting Papier (GB002, Fa. Schleicher&Schuell) wurde mit Wasser befeuchtet und in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl pH7,6; 127 mM NaCl; 0,1% Tween 20; 0,01% NaN_3) äquilibriert.

25 Aus einer Lösung von β A4-Peptid in Wasser (2 mg/ml) wurden 10, 5 und 2,5 μ g Peptid in 0,2 ml TBST-Puffer auf die Membran appliziert. Nach 15 min. Inkubation wurde die Peptidlösung durch die Membran gesaugt, mit 0,2 ml TBST-Puffer nachgespült, die Membran aus der Dot-Blot-kammer
 30 entfernt und 30 min bei 37°C getrocknet.

Vor der Inkubation mit Farbstoffen wurde die getrocknete Membran unter leichtem Schütteln für zwei Stunden mit TBST-Block-Puffer (TBST, s. o.; 5% Milchpulver) inkubiert und anschließenden 5 min mit TBST-Puffer gewaschen.

5 Die Inkubation mit Farbstoffen erfolgte durch leichtes Schütteln der Membranen in 0,0005 - 0,05 %igen Lösungen des Farbstoffes in TBST. Danach wurde fünfmal mit TBST-Puffer gewaschen, die Membran bei Raumtemp. getrocknet und eingeschweißt.

10

2) Auswertung mittels Fluoreszenzdetektion

Die laserinduzierten Fluoreszenzaufnahmen werden an einem experimentellen Fluoreszenzbildgebungssystem
15 durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit monochromatischem Laserlicht der Wellenlänge 740 nm durch Auskopplung der Strahlung über ein Lichtleitersystem und homogene Ausleuchtung der Cellulosemembranen. Das reflektierte Anregungslicht wird durch einen Kantenfilter abgeblockt, das
20 laserinduzierte Fluoreszenzlicht oberhalb 740 nm mit einer CCD-Kamera (Charge Coupled Device) aufgenommen und die Daten als Schwarz-Weiß-Bilder gespeichert.

20

In Fig. 1 bis 2 sind Beispiele für Fluoreszenzaufnahmen der Membranen gezeigt.

25

Fig. 1:

Fluoreszenzaufnahme der Cellulosemembran nach Inkubation mit Bis-1,1'-(4-Sulfobutyl)indotricarbocyanin, Natriumsalz (0,005% Lsg.).

30

Anregungswellenlänge 740 nm, Detektion > 780 nm

1: 2,5 µg β -Amyloid(1-42)

2: 5 µg β -Amyloid(1-42)

3: 10 µg β -Amyloid(1-42)

35

4: Kontrollpeptide mit ähnlichen Bindungseigenschaften an die Cellulosemembran

Fig. 2:

Fluoreszenzaufnahme der Cellulosemembran nach Inkubation
mit 4-[5-[3-Carboxy-3-hydroxy-1-(4-sulfophenyl)-1H-pyrazol-4-yl]-2,4-pentadienyliden]-4,5-dihydro-5-oxo-1-(4-sulfobutyl)-1H-pyrazol-3-carbonsäure, Dikaliumsalz
5 (0,005% Lsg.)

Anregungswellenlänge 650 nm, Detektion > 680 nm

5: 2,5 µg β-Amyloid(1-42)

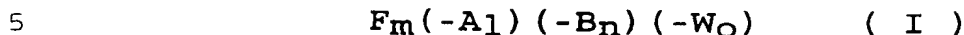
6: 5 µg β-Amyloid(1-42)

10 7: 10 µg β-Amyloid(1-42)

8: Kontrollpeptide mit ähnlichen Bindungseigenschaften an
die Cellulosemembran

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I



worin

F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens
ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm
10 aufweist,

A ein an β -Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist,
B ein an β -Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist,
W ein an β -Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles,
niedermolekulares Strukturelement ist,

15 m für die Zahl 1 oder 2 steht oder, mit der Maßgabe,
daß n und o Null bedeuten, für eine ganze Zahl 3 - 20
steht,

l und n unabhängig voneinander für eine Zahl 0, 1
20 oder 2 stehen,
o für eine ganze Zahl 0, 1, 2, 3 oder 4 steht,
mit der Maßgabe, daß die Summe aus l, n und o ≥ 1 ist

sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

25

2. Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß in der allgemeinen Formel I

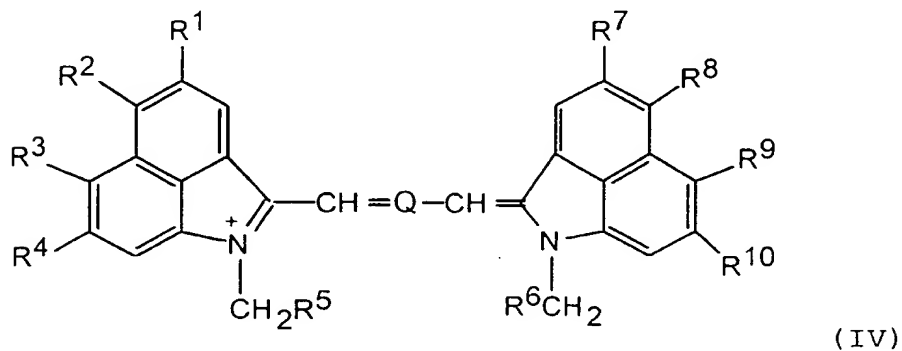
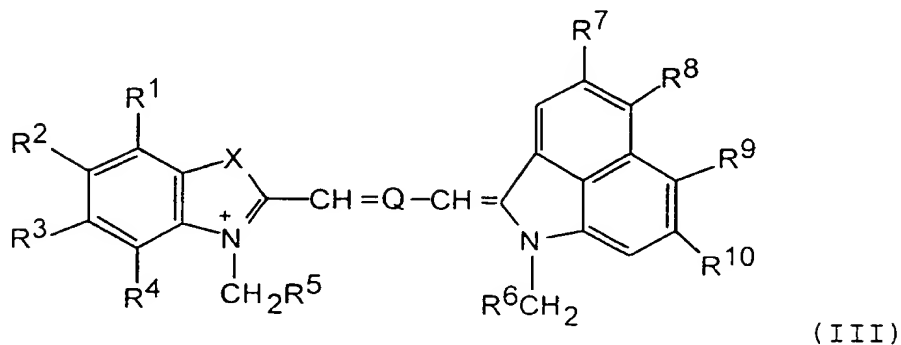
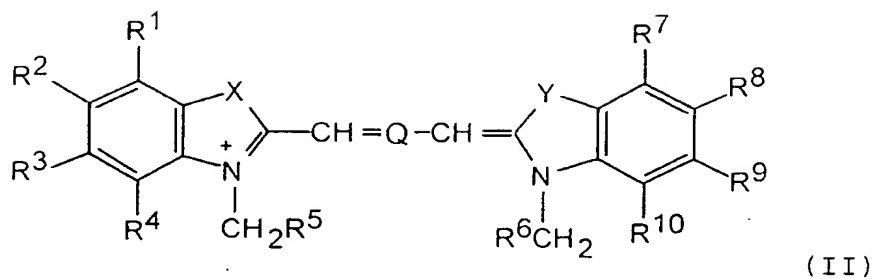
F für einen Cyanin-, Squarilium-, Croconium-,
Merocyanin- oder Oxonolfarbstoff steht.

30

3. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß in der allgemeinen Formel I

F für einen Cyanin-, Squarilium- oder Croconiumfarb-
stoff der allgemeinen Formeln II - IV

35



5 worin

10 R¹ bis R⁴ und R⁷ bis R¹⁰ unabhängig voneinander für
ein Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitro-
gruppe oder für einen Rest -COE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹,
-NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,
-E¹,

15 wobei E¹ und E² unabhängig voneinander für ein
Wasserstoffatom, eine gesättigte oder ungesät-
tigte, verzweigte oder geradkettige C₁-C₅₀-Alkyl-
kette, wobei die Kette oder Teile dieser Kette
gegenbenenfalls eine oder mehrere aromatische
oder gesättigte zyklische C₅-C₆- oder bizyklische

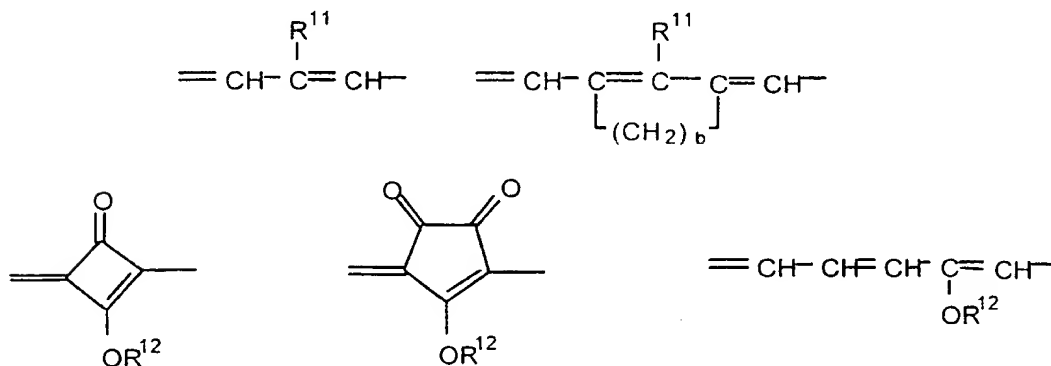
C₁₀-Einheiten formen können, steht, und wobei die C₁-C₅₀-Alkylkette von 0 bis 15 Sauerstoffatomen und/oder von 0 bis 3 Carbonylgruppen unterbrochen ist und/oder mit 0 bis 5 Hydroxygruppen substituiert ist,

stehen, und wobei jeweils benachbarte Reste R₁ - R₄ und/oder R₇ - R₁₀ unter Bildung eines sechsgliedrigen aromatischen Kohlenstoffringes miteinander verknüpft sein können,

oder für eine Bindung an A, B oder W stehen,

R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für einen Rest -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung oder für eine C₁-C₄-Sulfoalkylkette stehen,

Q ein Fragment



worin

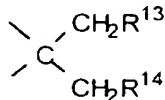
R¹¹ für ein Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Iodatome oder eine Nitrogruppe oder einen Rest -NE¹E², -OE¹ oder -E¹, wobei E¹ und E² die oben angegebene Bedeutung haben, steht,

R¹² für ein Wasserstoffatom oder einen Rest E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung steht,

b eine Zahl 0, 2 oder 3 bedeutet,

darstellt,

X und Y unabhängig voneinander O, S, -CH=CH- oder ein Fragment



5

worin

R¹³ und R¹⁴ unabhängig voneinander für Wasserstoff, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder geradkettige C₁ - C₁₀-Alkylkette, die durch bis zu 5 Sauerstoffatome unterbrochen und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann, stehen, und wobei die Reste R¹³ und R¹⁴ unter Ausbildung eines 5- oder 6-gliedrigen Ringes miteinander verknüpft sein können,

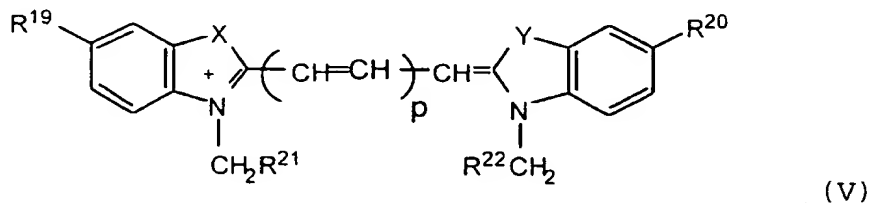
15

bedeuten,

steht.

4. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I
- F einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel V

20



25

worin

p eine ganze Zahl 2 oder 3 bedeutet,

X und Y unabhängig voneinander für O, S, -CH=CH- oder C(CH₃)₂ stehen,

30

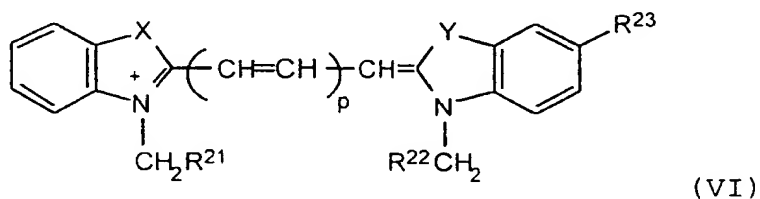
R¹⁹ und R²⁰ unabhängig voneinander einen Rest
 -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E²,
 -OE¹, -OSO₃H, -SO₃H, -E¹, wobei E¹ und E² die
 oben angegebene Bedeutung haben, mit der Maßgabe,
 daß E¹ und E² nicht gleichzeitig Wasserstoffatome
 sind, darstellen,

R²¹ und R²² unabhängig voneinander für einen Rest
 -E¹ mit der oben angegebenen Bedeutung, für eine
 C₁-C₄-Sulfoalkylkette

oder R¹⁹, R²⁰, R²¹, R²², E¹ oder E² für eine Bin-
 dung an A, B oder W mit der oben angegebenen Be-
 deutung stehen,

darstellt.

5. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-
 zeichnet, daß in der allgemeinen Formel I
 F einen Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel VI



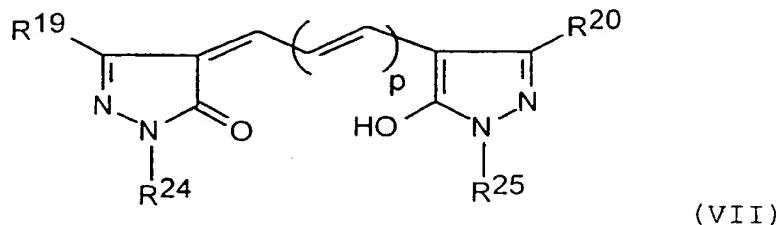
worin

p, X, Y, R²¹ und R²² die oben angegebene Bedeu-
 tung haben,

R²³ für -OE³, -COOE³, -CONHE³, -CONH(CH₂)₁₋₆-
 NHE³, -CONH(CH₂)₁₋₆-OE³, -CONH(CH₂)₁₋₆-COOE³ oder
 -CONH(CH₂)₁₋₆-CONHE³ steht, worin
 E³ für ein Mono-, Oligo- oder Polysaccharid mit
 mindestens einem Rest -OSO₃H steht,

darstellt.

6. Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I F einen Oxonolfarbstoff der allgemeinen Formel VII,



10

worin

p, R¹⁹ und R²⁰ die oben angegebene Bedeutung haben,

15

R²⁴ und R²⁵ unabhängig voneinander für einen einfach bis dreifach mit Hydroxy-, Carboxy-, Sulfat-, Sulfonat, Alkyl- oder Alkoxy- oder Carbonsäureesterresten substituierten Phenylring stehen,

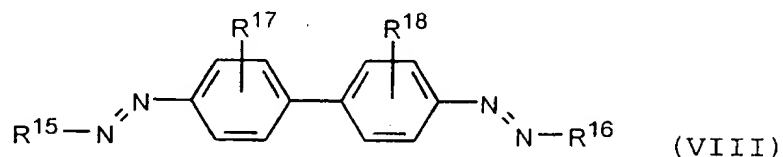
20

bedeutet.

7. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I
- 25 A für Antikörper, Antikörperfragmente, spezifische Peptide und Proteine, Rezeptoren, Enzyme, Enzymsubstrate, Nukleotide, Ribonukleinsäuren, Desoxyribonukleinsäuren, Lipoproteine, Kohlenhydrate, Mono-, Di- oder Trisaccharide, lineare oder verzweigte
- 30 Oligo- oder Polysaccharide oder -saccharidderivate oder für ein Dextran steht.

8. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I

B einen Diazofarbstoff der allgemeinen Formel VIII



worin

10 R¹⁵ und R¹⁶ unabhängig voneinander für einen mit einer oder mehreren Hydroxy-, Carboxy-, Amino-, Sulfonsäure-, Alkoxycarbonyl-, Alkylamino-, Dialkylamino-, Alkoxy-, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen im Alkylrest, oder Arylsulfonylgruppen, mit bis zu 9 Kohlenstoffatomen im Arylrest, substitu-

15 ierten Phenyl- oder Naphthylrest, oder für einen Farbstoff F, steht,

20 R¹⁷ und R¹⁸ unabhängig voneinander für einen Hydroxy-, Carboxy-, Sulfonsäure-, Alkyl-, Alkoxyrest, mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, stehen, darstellt.

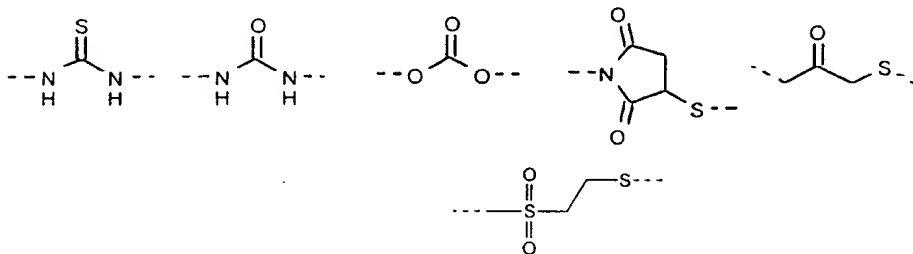
- 25 9. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der allgemeinen Formel I

W für einen Rest -OSO₃H oder -SO₃H, einen unverzweigten, verzweigten, cyclischen oder polycyclischen Alkyl-, Alkenyl-, Polyalkenyl-, Alkinyl-, Aryl-, Alkylaryl- oder Arylalkylrest mit bis zu 60 C-Atomen, welcher mit bis zu 5 Hydroxygruppen, bis zu 3 Carbonsäuregruppen und mindestens einem Rest -OSO₃H oder -SO₃H substituiert ist,

30

steht.

10. Verbindungen nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß F mit A, B
 5 und/oder W, unabhängig voneinander, über eine Ester-, Ether-, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe, Amidgruppe oder über eine Gruppe



10

verknüpft ist.

11. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur In-vivo-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels NIR-Strahlung.
 15

12. Verwendung von Verbindungen nach Anspruch 1 zur In-vitro-Diagnostik neurodegenerativer Gewebe mittels NIR-Strahlung.
 20

13. Optisches Diagnostikum zur In-vivo-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten mittels NIR-Strahlung, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine Verbindung nach Anspruch 1 zusammen mit den üblichen Hilfs- und Trägerstoffen sowie Verdünnungsmitteln enthält.
 25

Fig. 1

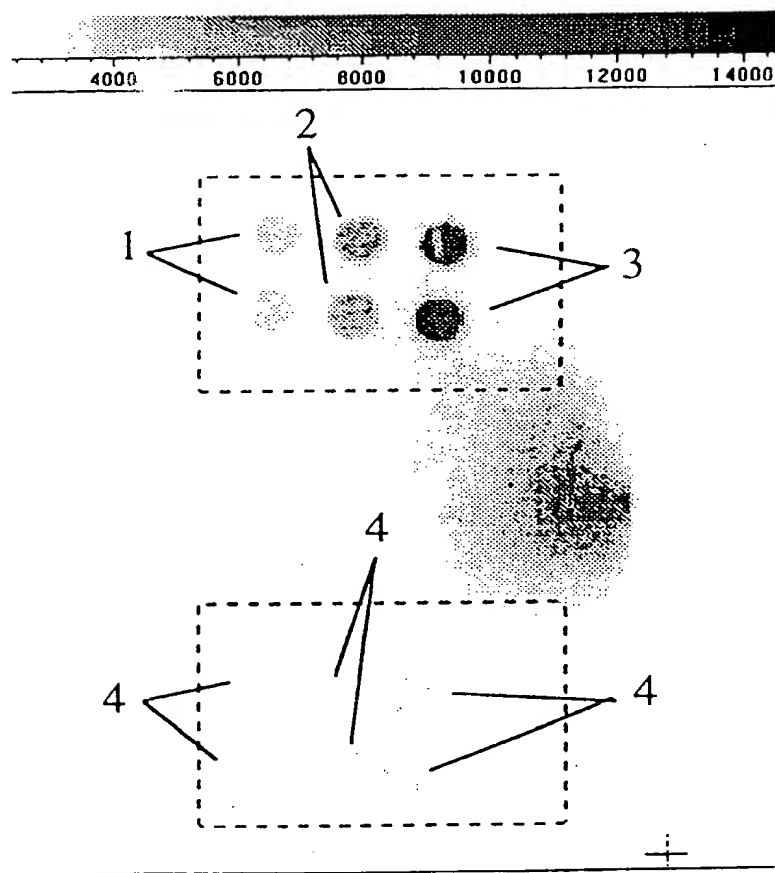
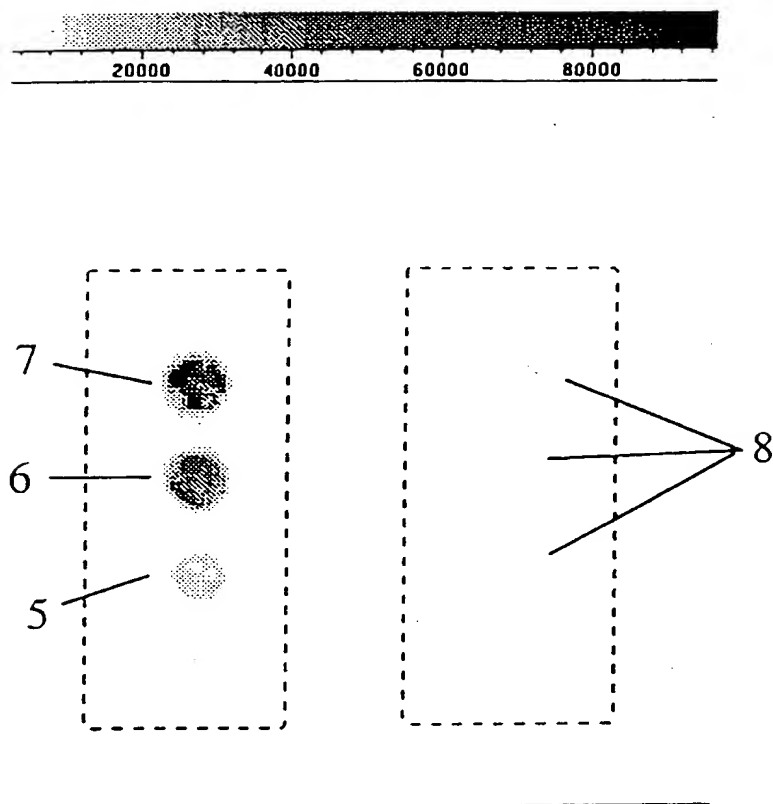


Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 49/00, G01N 33/58, 33/533 | A3 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/22146 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/02559 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1997 (29.10.97) (30) Prioritätsdaten: 196 49 971.2 19. November 1996 (19.11.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR DIAGNOSTIKFORSCHUNG GMBH AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TURNER, Jonathan [DE/DE]; Ortwindstrasse 7, D-13465 Berlin (DE). DYRKES, Thomas [DE/DE]; Käthe-Kollwitz-Strasse 25, D-16540 Hohenneuendorf (DE). SEMMLER, Wolfhard [DE/DE]; Jahnstrasse 17, D-13467 Berlin (DE). LICHA, Kai [DE/DE]; Argentinische Allee 179, D-14169 Berlin (DE). RIEFKE, Björn [DE/DE]; Königstrasse 25, D-14109 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE). | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, HU, JP, KR, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 15. Oktober 1998 (15.10.98) | |
| (54) Title: OPTICAL DIAGNOSTIC AGENTS FOR DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES BY MEANS OF NEAR INFRARED RADIATION (NIR RADIATION) (54) Bezeichnung: OPTISCHE DIAGNOSTIKA ZUR DIAGNOSTIK NEURODEGENERATIVER KRANKHEITEN MITTELS NAHINFRAROT-STRAHLUNG (NIR-STRAHLUNG) (57) Abstract The invention relates to compounds of formula (I): $F_m(-A_1)(-B_n)(-W_o)$ wherein F is a colorant-signal molecule with a maximum absorption value ranging from 600 - 1200 nm; A is a β -amyloid plaque binding biomolecule; B is a β -amyloid plaque binding colorant; and W is a β -amyloid plaque binding hydrophilic low-molecular structural element. The invention also describes the use of these compounds in in vivo and in vitro diagnosis of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease by means of near infra-red radiation (NIR radiation) as a contrasting agent in fluorescence and transillumination diagnosis in the NIR range. Diagnostic agents containing said components are also disclosed. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I): $F_m(-A_1)(-B_n)(-W_o)$, worin F ein Farbstoff-Signalmolekül ist, welches mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 600 bis 1200 nm aufweist; A ein an β -Amyloid-Plaques bindendes Biomolekül ist; B ein an β -Amyloid-Plaques bindender Farbstoff ist; W ein an β -Amyloid-Plaques bindendes hydrophiles, niedermolekulares Strukturelement ist; sowie die Verwendung dieser Verbindungen zur In-vivo- und In-vitro-Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten, wie der Alzheimerschen Krankheit, mittels Nahinfrarot-Strahlung (NIR-Strahlung) als Kontrastmittel in der Fluoreszenz- und Transilluminationsdiagnostik im NIR-Bereich und diese Verbindungen enthaltende diagnostische Mittel. | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenja | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/DE 97/02559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K49/00 G01N33/58 G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K G01N C09B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | PARESCE DM ET AL: "Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor." NEURON, SEPTEMBER 1996, VOL. 17, NO. 3, PAGE(S) 553-65, XP002063322 UNITED STATES see abstract see page 554, right-hand column - page 555 --- | 1-5,7-13 |
| Y | THANOS S.: "Function-dependent labelling of microglial cells by means of carbocyanine dyes in vivo" CLIN. NEUROPATHOL., 1993, VOL. 12, NO. 5, PAGE(S) 298-301, XP002063323 siehe Absatz INTRODUCTION see paragraph 3 --- | 1-5,7-13 |
| | --- -/-- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 August 1998

Date of mailing of the international search report

24.08.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dullaart, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/02559

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y | WO 96 17628 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST ;LICHA KAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); SEMM) 13 June 1996 see examples --- | 1-5,7-13 |
| Y | MURPHY G M ET AL: "DEVELOPMENT OF A MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR THE COOH -TERMINAL OF BETA-AMYLOID 1-42 AND ITS IMMUNOHISTOCHEMICAL REACTIVITY IN ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED DISORDERS" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 144, no. 5, 1 May 1994, pages 1082-1088, XP000573948 see paragraph RESULTS --- | 1-5,7-13 |
| Y | HEEGAARD N H H ET AL: "Demonstration of a heparin-binding site in serum amyloid P component using affinity capillary electrophoresis as an adjunct technique" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 1, no. 717, 24 November 1995, page 83-90 XP004038530 see abstract see paragraph 2.4 see page 87 - page 88 --- | 1-5,7-13 |
| Y | MALLE E ET AL: "Quantification and mapping of antigenic determinants of serum amyloid A (SAA) protein utilizing sequence-specific immunoglobulins and Euas a specific probe for time-resolved fluorometric immunoassay" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 1, no. 182, 11 May 1995, page 131-144 XP004021187 see abstract see paragraph 2.2 see paragraph 2.4 - paragraph 2.5 see paragraph 4 --- | 1-5,7-13 |
| Y | REIFFERS S ET AL: "Cyclotron isotopes and radiopharmaceuticals - XXXIII. Synthesis and structural effects of selective biliary excretion of halogenated indotricarbocyanines" INT. J. APPL. RADIAT. ISOT., 1983, VOL. 34, NO. 9, PAGE(S) 1383-93, XP002063345 see abstract see figures --- -/-- | 1-5,7-13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/02559

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | MANK A J G ET AL: "VISIBLE DIODE LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTION IN LIQUID CHROMATOGRAPHY AFTER PRECOLUMN DERIVATIZATION OF AMINES" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 67, 1995, pages 1742-1748, XP002012845 siehe Absatz RESULTS AND DISCUSSION --- | 1-5,7-13 |
| A | FOLEY P ET AL: "EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF ANTIBODIES TO CHOLINERGIC NEURONS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE" JOURNAL OF NEUROLOGY - ZEITSCHRIFT FÜR NEUROLOGIE, vol. 235, 1988, pages 466-471, XP000600413 see abstract see paragraph RESULTS --- | 1-5,7-13 |
| Y | ERNST L A ET AL: "CYANINE DYE LABELING REAGENTS FOR SULFHYDRYL GROUPS" CYTOMETRY, vol. 10, no. 1, 1 January 1989, pages 3-10, XP000071370 see page 8, right-hand column, last paragraph - page 9 --- | 1-5,7-13 |
| Y | SHIGEO YASUI ET AL: "SYNTHESES AND SOME PROPERTIES OF INFRARED-ABSORBING CROCONIUM AND RELATED DYES" DYES AND PIGMENTS, vol. 10, no. 1, 1989, pages 13-22, XP000008808 see figure 1 see table 1 see paragraph 2.2 see paragraph 2.4 --- | 1-3,7-13 |
| Y | NARAYANAN N ET AL: "A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF HEPTAMETHINE CYANINE DYES: SYNTHESIS OF NEW NEAR-INFRARED FLUORESCENT LABELS" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 60, 1995, pages 2391-2395, XP002065376 see the whole document --- -/-- | 1-13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No

PCT/DE 97/02559

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y | <p>DATABASE DISSAB University Microfilms International AN: AAD97-16685, WILLIAMS, RICHARD JAMES, III: "DEVELOPMENT OF A SOLID PHASE IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G: A NOVEL BIO-ANALYTICAL APPLICATION OF SEMICONDUCTOR LASER INDUCED NEAR-INFRARED FLUORESCENCE" XP002073426 see abstract & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL. VOLUME: 57, NO: 12, SECTION: B, PAGE: 7499. ABSTRACT OF PH.D. THESIS, 1996, GEORGIA UNIVERSITY, 213 PAGES,</p> | 1-13 |
| Y | <p>MUJUMDAR R B ET AL: "CYANINE DYE LABELING REAGENTS: SULFOINDOCYANINE SUCCINIMIDYL ESTERS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 4, no. 2, March 1993, pages 105-111, XP000654181 see page 105 see figures 1,2 see tables 1,2</p> | 1-13 |
| Y | <p>JP 04 194 841 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 14 July 1992 see page 280 see page 289</p> | 1-13 |
| Y | <p>GRAEBERT KS ET AL: "Localization and regulated release of Alzheimer amyloid precursor-like protein in thyrocytes." LABORATORY INVESTIGATIONS, MAY 1995, VOL. 72, NO. 5, PAGE(S) 513-23, XP002073425 see abstract see page 520</p> | 1-13 |
| X | <p>BELLOC F ET AL: "SELECTIVE STAINING OF IMMATURE HEMOPOIETIC CELLS WITH MEROCYANINE 540 IN FLOW CYTOMETRY" CYTOMETRY, vol. 9, no. 1, 1 January 1988, pages 19-24, XP000567952 see abstract see page 21 - page 23</p> | 1,2,7-13 |
| A | <p>WILLIAMS R J ET AL: "INSTRUMENT TO DETECT NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IN SOLID-PHASE IMMUNOASSAY" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 66, no. 19, 1 October 1994, pages 3102-3107, XP000478176 see the whole document</p> | 1-13 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE97/02559

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-5, 7-13 partially
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-3 and 7-13 partially, and 4-5
2. Claims: 1-3 and 7-13 partially
3. Claims: 1-3 and 7-13 partially
4. Claims: 1, 2 and 7-13 partially
5. Claims: 1, 2 and 7-13 partially, and 6
1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☒
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 97/02559

Claims: 1-5, 7-13 partially

In view of the large number of compounds which are theoretically defined in the independent Claims, the search had to be restricted for economic reasons. The search was restricted to substances supported by pharmacological data and/or to the compounds to which specific claim was laid and to the underlying idea of the present Application. (See Guidelines, Chapter III, Paragraph 2.3).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/02559

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9617628 | A | 13-06-1996 | DE 4445065 A | 13-06-1996 |
| | | | AU 3740995 A | 26-06-1996 |
| | | | CA 2205906 A | 13-06-1996 |
| | | | CN 1174511 A | 25-02-1998 |
| | | | EP 0796111 A | 24-09-1997 |
| | | | HU 77378 A | 28-04-1998 |
| | | | NO 972509 A | 02-06-1997 |
| | | | ZA 9509707 A | 29-05-1996 |
| ----- | | | | |
| JP 04194841 | A | 14-07-1992 | JP 2676117 B | 12-11-1997 |
| ----- | | | | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02559

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K49/00 G01N33/58 G01N33/533

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K G01N C09B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | PARESC DM ET AL: "Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor." NEURON, SEPTEMBER 1996, VOL. 17, NO. 3, PAGE(S) 553-65, XP002063322 UNITED STATES siehe Zusammenfassung siehe Seite 554, rechte Spalte - Seite 555 | 1-5,7-13 |
| Y | THANOS S.: "Function-dependent labelling of microglial cells by means of carbocyanine dyes in vivo" CLIN. NEUROPATHOL., 1993, VOL. 12, NO. 5, PAGE(S) 298-301, XP002063323 siehe Absatz INTRODUCTION siehe Absatz 3 | 1-5,7-13 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. August 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24.08.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dullaart, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02559

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| Y | WO 96 17628 A (DIAGNOSTIKFORSCHUNG INST ;LICHAKAI (DE); RIEFKE BJOERN (DE); SEMM) 13. Juni 1996 siehe Beispiele --- | 1-5,7-13 |
| Y | MURPHY G M ET AL: "DEVELOPMENT OF A MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR THE COOH -TERMINAL OF BETA-AMYLOID 1-42 AND ITS IMMUNOHISTOCHEMICAL REACTIVITY IN ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED DISORDERS" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 144, Nr. 5, 1. Mai 1994, Seiten 1082-1088, XP000573948 siehe Absatz RESULTS --- | 1-5,7-13 |
| Y | HEEGAARD N H H ET AL: "Demonstration of a heparin-binding site in serum amyloid P component using affinity capillary electrophoresis as an adjunct technique" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, Bd. 1, Nr. 717, 24. November 1995, Seite 83-90 XP004038530 siehe Zusammenfassung siehe Absatz 2.4 siehe Seite 87 - Seite 88 --- | 1-5,7-13 |
| Y | MALLE E ET AL: "Quantification and mapping of antigenic determinants of serum amyloid A (SAA) protein utilizing sequence-specific immunoglobulins and Eusa a specific probe for time-resolved fluorometric immunoassay" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Bd. 1, Nr. 182, 11. Mai 1995, Seite 131-144 XP004021187 siehe Zusammenfassung siehe Absatz 2.2 siehe Absatz 2.4 - Absatz 2.5 siehe Absatz 4 --- | 1-5,7-13 |
| Y | REIFFERS S ET AL: "Cyclotron isotopes and radiopharmaceuticals - XXXIII. Synthesis and structural effects of selective biliary excretion of halogenated indotricarbocyanines" INT. J. APPL. RADIAT. ISOT., 1983, VOL. 34, NO. 9, PAGE(S) 1383-93, XP002063345 siehe Zusammenfassung siehe Abbildungen --- -/-- | 1-5,7-13 |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | MANK A J G ET AL: "VISIBLE DIODE LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTION IN LIQUID CHROMATOGRAPHY AFTER PRECOLUMN DERIVATIZATION OF AMINES" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 67, 1995, Seiten 1742-1748, XP002012845 siehe Absatz RESULTS AND DISCUSSION --- | 1-5,7-13 |
| A | FOLEY P ET AL: "EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF ANTIBODIES TO CHOLINERGIC NEURONS IN THE SERUM OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE" JOURNAL OF NEUROLOGY - ZEITSCHRIFT FÜR NEUROLOGIE, Bd. 235, 1988, Seiten 466-471, XP000600413 siehe Zusammenfassung siehe Absatz RESULTS --- | 1-5,7-13 |
| Y | ERNST L A ET AL: "CYANINE DYE LABELING REAGENTS FOR SULFHYDRYL GROUPS" CYTOMETRY, Bd. 10, Nr. 1, 1. Januar 1989, Seiten 3-10, XP000071370 siehe Seite 8, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 9 --- | 1-5,7-13 |
| Y | SHIGEO YASUI ET AL: "SYNTHESES AND SOME PROPERTIES OF INFRARED-ABSORBING CROCONIUM AND RELATED DYES" DYES AND PIGMENTS, Bd. 10, Nr. 1, 1989, Seiten 13-22, XP000008808 siehe Abbildung 1 siehe Tabelle 1 siehe Absatz 2.2 siehe Absatz 2.4 --- | 1-3,7-13 |
| Y | NARAYANAN N ET AL: "A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF HEPTAMETHINE CYANINE DYES: SYNTHESIS OF NEW NEAR-INFRARED FLUORESCENT LABELS" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 60, 1995, Seiten 2391-2395, XP002065376 siehe das ganze Dokument --- | 1-13 |
| | --- | |
| | -/-- | |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| Y | <p>DATABASE DISSAB University Microfilms International AN: AAD97-16685, WILLIAMS, RICHARD JAMES, III: "DEVELOPMENT OF A SOLID PHASE IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN G: A NOVEL BIO-ANALYTICAL APPLICATION OF SEMICONDUCTOR LASER INDUCED NEAR-INFRARED FLUORESCENCE" XP002073426 siehe Zusammenfassung & DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL. VOLUME: 57, NO: 12, SECTION: B, PAGE: 7499. ABSTRACT OF PH.D. THESIS, 1996, GEORGIA UNIVERSITY, 213 PAGES,</p> | 1-13 |
| Y | <p>--- MUJUMDAR R B ET AL: "CYANINE DYE LABELING REAGENTS: SULFOINDOCYANINE SUCCINIMIDYL ESTERS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd. 4, Nr. 2, März 1993, Seiten 105-111, XP000654181 siehe Seite 105 siehe Abbildungen 1,2 siehe Tabellen 1,2</p> | 1-13 |
| Y | <p>--- JP 04 194 841 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 14. Juli 1992 siehe Seite 280 siehe Seite 289</p> | 1-13 |
| Y | <p>--- GRAEBERT KS ET AL: "Localization and regulated release of Alzheimer amyloid precursor-like protein in thyrocytes." LABORATORY INVESTIGATIONS, MAY 1995, VOL. 72, NO. 5, PAGE(S) 513-23, XP002073425 siehe Zusammenfassung siehe Seite 520</p> | 1-13 |
| X | <p>--- BELLOC F ET AL: "SELECTIVE STAINING OF IMMATURE HEMOPOIETIC CELLS WITH MEROCYANINE 540 IN FLOW CYTOMETRY" CYTOMETRY, Bd. 9, Nr. 1, 1. Januar 1988, Seiten 19-24, XP000567952 siehe Zusammenfassung siehe Seite 21 - Seite 23</p> | 1,2,7-13 |
| A | <p>--- WILLIAMS R J ET AL: "INSTRUMENT TO DETECT NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IN SOLID-PHASE IMMUNOASSAY" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 66, Nr. 19, 1. Oktober 1994, Seiten 3102-3107, XP000478176 siehe das ganze Dokument -----</p> | 1-13 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/ 02559

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-5, 7-13 teilweise
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
 Siehe WEITERE ANGABE PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Ansprüche: 1-3 und 7-13 teilweise, und 4-5
 2. Ansprüche: 1-3 und 7-13 teilweise
 3. Ansprüche: 1-3 und 7-13 teilweise
 4. Ansprüche: 1,2 und 7-13 teilweise
 5. Ansprüche: 1,2 und 7-13 teilweise, und 6
1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
 2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
 3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
 4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☒ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Ansprüche Nr.: 1-5, 7-13 teilweise

Wegen der großen Zahl der Verbindungen, die in den unabhängigen Ansprüchen theoretisch definiert werden, mußte die Recherche aus ökonomischen Gründen eingeschränkt werden. Die Recherche beschränkte sich auf die durch pharmakologische Daten gestützte Substanzen und/oder auf die spezifisch beanspruchte Verbindungen, sowie auf den unterliegenden Gedanken der vorliegenden Anmeldung. (Siehe Richtlinien, Kapitel III, Paragraph 2.3).

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02559

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9617628 A | 13-06-1996 | DE 4445065 A | 13-06-1996 |
| | | AU 3740995 A | 26-06-1996 |
| | | CA 2205906 A | 13-06-1996 |
| | | CN 1174511 A | 25-02-1998 |
| | | EP 0796111 A | 24-09-1997 |
| | | HU 77378 A | 28-04-1998 |
| | | NO 972509 A | 02-06-1997 |
| | | ZA 9509707 A | 29-05-1996 |
| JP 04194841 A | 14-07-1992 | JP 2676117 B | 12-11-1997 |